

早稲田大学大学院理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

両生類プロラクチン受容体の  
分子内分泌学的研究

(Molecular endocrinological study of  
prolactin receptors in amphibians)

申請者

専攻・研究指導  
(課程内のみ) 氏名

2004 年 12 月

プロラクチン (PRL) は脊椎動物の下垂体前葉から分泌されるホルモンの中で最も多様な生理作用を持つ。両生類では生殖行動の誘起、生殖関連器官の発達、フェロモンの合成促進、幼生の成長促進と変態抑制などに関与する。今までにこれら PRL の生理作用について、多くの研究がなされてきたが、PRL 受容体の観点からこれらの現象を解析した研究はほとんど行なわれていなかった。そこで申請者は無尾両生類ウシガエルの変態、有尾両生類イモリの生殖現象に焦点をあて、それらの現象に PRL 受容体がどのように関わっているかを明らかにすることを目的として研究を進めた。

第 1 章では両生類で、今までに PRL の変態、生殖におよぼす作用についてどのような研究が行われてきたかについて述べている。さらに本研究の目的、意義について述べている。すなわち、変態期幼生の PRL 受容体の発現解析を行ない、変態最盛期後期に血中 PRL レベルが上昇する生理的意義を解明すること、生殖関連器官での PRL 受容体の発現解析をすること、PRL が中枢のどの部位に作用して求愛行動を誘起するかを特定すること、などである。

第 2 章では無尾両生類ウシガエル PRL 受容体 cDNA クローニングおよび PRL 受容体 mRNA の発現解析について述べている。ウシガエル幼生の尾ひれ全 RNA を用い、RT-PCR および 5', 3'RACE 法でウシガエル PRL 受容体をコードする cDNA を得た。得られた cDNA の塩基配列より推定されるアミノ酸配列は他種 PRL 受容体アミノ酸配列との相同性は比較的低い、リガンドとの結合、シグナルの伝達に関わると考えられる配列は保存されており、PRL 受容体としての機能は保存されていると考えられた。次いで哺乳類発現ベクターに組み込んだウシガエル PRL 受容体 cDNA を COS-7 細胞にトランスフェクトし、タンパク質を発現させ、その膜タンパク質を使って binding assay を行なうと、ウシガエル PRL に特異的に結合した。変態期 (変態始動期および変態最盛期) 幼生器官および組織での PRL 受容体 mRNA の発現分布を RT-PCR により解析すると、主に脳、肺、腎臓、皮膚、尾で発現していた。PRL 受容体 mRNA は幼生特異的な器官のみならず、幼生および成体でも機能する器官、成体で機能する器官のいずれでも検出された。幼生特異的器官として尾ひれを、変態期に発達をとげる器官として腎臓を選び、それぞれ変態期に PRL 受容体 mRNA レベルがどのように変化するかを RNase protection assay で、PRL 受容体 mRNA の局在を in situ hybridization により調べた。その結果、尾ひれでは変態最盛期前期で PRL 受容体 mRNA レベルが上昇し、退縮が顕著になる変態最盛期中期でもそのレベルは維持されていることがわかった。変態始動期では尾ひれでは主に皮膚で PRL 受容体 mRNA シグナルがみられたが、変態最盛期では皮膚と結合組織の繊維芽細胞に特異的シグナルが見られた。腎臓では変態始動期から変態最盛期にむけ PRL 受容体 mRNA レベルは上昇し続け、変態完了後の幼若ガエルでも比較的高いレベルで維持されていた。また、変態始動期、変態最盛期ともに、尿管上皮細胞に PRL 受容体 mRNA のシグナルが見られたが、変態最盛期ではそ

のシグナルが強まっていた。今回の結果により尾ひれでは甲状腺ホルモンレベルの高まる変態最盛期に PRL に対する感受性を増すことで甲状腺ホルモンによる急激な尾の退縮を抑制し、変態期の絶食中のエネルギー源、および成体に必要な器官の発達のための物質を、尾を徐々に退縮させることでたえず供給できるようにしていると推測された。また、PRL は腎臓に作用し、水中生活から陸上生活に適応した腎臓の構造や機能の発達に關与することが示唆された。

第 3 章では有尾両生類シリケンイモリ肛門部腹腺の PRL 受容体 mRNA の発現解析について述べている。申請者はシリケンイモリ PRL 受容体 cDNA を肛門部腹腺 cDNA ライブラリーよりクローニングした。この cDNA 配列をもとにプライマーを設計し、半定量的 RT-PCR/サザンブロット解析で性的に発達した個体と未発達な個体の肛門部腹腺の mRNA 発現レベルを解析すると、性的に発達した個体の PRL 受容体 mRNA レベルが未発達個体に比べ、有意に高まっていることが明らかになった。さらに、in situ hybridization 法により、性的に発達した個体では肛門部腹腺上皮細胞に特異的に PRL 受容体 mRNA の発現が見られたが、未発達個体の肛門部腹腺では特異的なシグナルは検出できなかった。この結果より、性的に発達した個体では、肛門部腹腺での PRL 受容体の発現が高まり、PRL に対する感受性を増大していることが分かり、これが腺構造の発達、フェロモンの合成能の上昇へつながると推測された。

第 4 章ではアカハライモリの脳内 PRL 受容体の発現部位の特定について述べている。免疫組織化学的手法で解析するために、イモリ PRL 受容体に特異的な抗体の作製を試みた。アカハライモリ、シリケンイモリ PRL 受容体細胞外領域アミノ酸配列の共通な 15 残基からなるペプチドを合成し、keyhole limpet hemocyanin を付加後、ウサギに免疫した。得られた抗血清は、抗原ペプチドカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。この抗体は、シリケンイモリ PRL 受容体 cDNA をトランスフェクトした COS-7 細胞から抽出したタンパク質を用いてウエスタンブロッティングを行なうと、75-100 kDa に特異的シグナルが得られた。このバンドのサイズはシリケンイモリ PRL 受容体 cDNA 配列から推測されるアミノ酸配列より計算される分子量 (67 kDa) よりも大きかった。シリケンイモリ PRL 受容体細胞外領域には 3 カ所のアスパラギン結合型糖鎖の付加可能部位があるため、glycopeptidase F でアスパラギン結合型糖鎖を除去すると 67 kDa にバンドが出現した。これらの結果より、この抗体はイモリ PRL 受容体を認識することが確認された。アカハライモリ雄の脳組織の細胞膜タンパク質を用いてウエスタンブロッティングを行なうと 160, 80, 60 kDa のバンドが検出され、80 kDa のバンドは glycopeptidase F 処理で 67 kDa のバンドにシフトした。その他のバンドは PRL 受容体のアイソフォーム、アスパラギン結合型糖鎖以外の修飾がなされていると考えられた。

一方、申請者は PRL の脳室内投与は腹腔内投与に比してはるかに微量で雄イ

モリの求愛行動を発現させることを見いだした。このことは中枢に PRL 受容体が存在することを示している。そこで抗体を用いた免疫組織化学的に受容体の存在を調べたところ脈絡叢，内側扁桃核，前方視索前野，大細胞性視索前核，視交叉上核，室周核，視床下部腹側核に PRL 受容体様免疫陽性細胞が確認された。さらに *in situ hybridization* 法により、脈絡叢，前方視索前野，大細胞性視索前核に特異的シグナルが見られた。哺乳類では脈絡叢の PRL 受容体は血中 PRL を脳脊髄液中に移送する役目があると考えられており、イモリでも脈絡叢 PRL 受容体により血中 PRL が脳脊髄液に移送され、神経細胞に直接作用する可能性が示唆された。さらにこの抗体を脳室内に投与すると、雄の求愛行動の発現を有意に抑えることがわかった。この結果より、この抗体が脈絡叢 PRL 受容体に結合し血中 PRL の脳脊髄液への移送が阻害したか、もしくは神経細胞の PRL 受容体に結合し、細胞内へのシグナル伝達をブロックし、求愛行動を抑制した可能性が示唆された。

また視索前核では PRL 受容体様免疫陽性細胞の一部が、アルギニンバソトシン、メソトシン様免疫陽性であることが分かった。この事実は、アルギニンバソトシン、メソトシンニューロンに PRL 受容体が発現し、PRL がこれらのニューロンに作用し、アルギニンバソトシンや、メソトシンの合成、分泌に何らかの影響を与えている可能性を示唆する。アルギニンバソトシンも PRL と同様に中枢に直接作用し、雄の求愛行動の発現を促進することがわかっている。このことから PRL により誘起される雄の求愛行動は、少なくとも一部はアルギニンバソトシンを介していると推測された。

第 5 章では本研究で得られた結論と今後の研究の進め方、現在進行している研究について述べている。ウシガエル変態期幼生は、PRL が甲状腺ホルモンによる急激な尾の退縮を抑え、変態完了まで尾から必要な養分を供給しつづけることを可能にすること、また器官によっては変態に伴う形態や機能の変化に寄与する可能性が示唆された。また、ウシガエル PRL 受容体にはアイソフォームが存在し、そのアイソフォームには膜貫通領域および細胞内領域が欠如していることがわかった。このアイソフォーム mRNA の幼生や成体の組織または器官での発現分布を RT-PCR で調べると既知 PRL 受容体と似ていた。また、甲状腺ホルモンを分泌する甲状腺で、PRL 受容体やそのアイソフォームが幼生前、変態期を通じて発現していることを確認した。今後の課題としては、このアイソフォームの生理的意義がどのようなものか、甲状腺に対する PRL の作用を明らかにすることなどがあげられる。またイモリでは性的に発達した個体では肛門部腹腺での PRL 受容体の発現が高まること、脳内の PRL 受容体の発現部位、視索前核のアルギニンバソトシン、メソトシンニューロンに PRL 受容体が発現していることが明らかになった。当面の課題としては、今回特定した脳内 PRL 受容体発現部位のうち、求愛行動に關与している部位を特定すること、またアルギニンバソトシンやメソトシンの合成や分泌に PRL が実際に關与するかを確かめることなどがあげられる。

# 研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>(1) Prolactin induces the newt courtship behavior acting centrally. <i>Gen.Comp. Endocrinol.</i> (掲載決定) Fumiyo Toyoda, <b>Itaru Hasunuma</b>, Kazutoshi Yamamoto, Masayuki Yamashita, Sakae Kikuyama</p> <p>(2) Localization of prolactin receptor in the newt brain. <i>Cell Tissue Res.</i> (掲載決定) <b>Itaru Hasunuma</b>, Fumiyo Toyoda, Kazutoshi Yamamoto, Masayuki Yamashita and Sakae Kikuyama</p> <p>(3) Molecular cloning of bullfrog prolactin receptor cDNA: changes in prolactin receptor mRNA level during metamorphosis. <i>Gen. Comp. Endocrinol.</i> (2004) 138: 200-210 <b>Itaru Hasunuma</b>, Kazutoshi Yamamoto and Sakae Kikuyama</p> <p>(4) Localization of prolactin receptor in the newt brain. In Trends in Comparative Endocrinology, (T. Oishi, et al. eds. Asia Oceania Society for Comparative Endocrinology) (2004) pp. 257-259 <b>Itaru Hasunuma</b>, Fumiyo Toyoda, Kazutoshi Yamamoto, Masayuki Yamashita and Sakae Kikuyama</p> <p>(5) Prolactin induces courtship behavior in the male newts acting centrally. In Trends in Comparative Endocrinology, (T. Oishi, et al. eds. Asia Oceania Society for Comparative Endocrinology) (2004) pp.46-48 Fumiyo Toyoda, <b>Itaru Hasunuma</b>, Kazutoshi Yamamoto, Masayuki Yamashita and Sakae Kikuyama</p> <p>(6) Expression of prolactin receptor mRNA in the abdominal gland of the newt <i>Cynops ensicauda</i>. <i>Comp. Biochem. Physiol. A</i> (2004) 138: 79-88 Hiroshi Matsukawa, <b>Itaru Hasunuma</b>, Takafumi Kato, Kazutoshi Yamamoto, Satoshi Miura, Takashi Fujita and Sakae Kikuyama</p> <p>(7) Peptide pheromones in newts. (2004) <i>Peptides</i> 25: 1531-1536 Fumiyo Toyoda, Kazutoshi Yamamoto, Takeo Iwata, <b>Itaru Hasunuma</b>, Marco Cardinali, G. Mosconi, A.M. Polzonetti-Magni, Sakae Kikuyama</p> <p>(8) Cloning of prolactin cDNA: Temperature-dependent prolactin mRNA expression In: Perspective in Comparative Endocrinology. (H. J. Th. Goos et al eds. Monduzzi Editore, Bologna) (2001) pp. 121-126. <b>Itaru Hasunuma</b>, Takeo Iwata, Noriyuki Takahashi, Kazutoshi Yamamoto, A. Marin, I Perroteu, C. Vellano and Sakae Kikuyama</p> <p>(9) Molecular cloning of newt prolactin (PRL) cDNA: Effect of temperature on PRL mRNA expression <i>Gen. Comp. Endocrinol.</i> (2001)121, 188-195 Noriyuki Takahashi, <b>Itaru Hasunuma</b>, Takeo Iwata, Kazutoshi Yamamoto, A. Marin, I. Perroteu, C. Vellano and Sakae Kikuyama</p>
講演	<p>(1) イモリプロラクチン受容体の脳内発現部位の解析 日本動物学会第 75 回大会（神戸）2004. 9 <b>蓮沼至</b>、豊田ふみよ、山本和俊、菊山榮</p> <p>(2) Molecular cloning of bullfrog prolactin receptor cDNA</p>

	International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology (韓国、済州島) 2003. 11 蓮沼至、山本和俊、菊山榮
--	---

# 研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
その他 （論文）	<p>(3) Prolactin induces courtship behavior in the male newts acting centrally International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology (韓国、済州島) 2003. 11 豊田ふみよ、<b>蓮沼至</b>、山本和俊、山下勝幸、菊山 榮</p> <p>(4) ウシガエル変態期幼生の尾および腎臓におけるプロラクチン受容体の mRNA レベル変化 日本動物学会第 74 回大会（函館）2003. 9 <b>蓮沼至</b>、山本和俊、菊山 榮</p> <p>(5) プロラクチンはイモリ求愛行動の持続性を増す 日本動物学会第 74 回大会（函館）2003. 9 豊田ふみよ、<b>蓮沼至</b>、山本和俊、山下勝幸、菊山 榮</p> <p>(6) 繁殖期および非繁殖期シリケンイモリ腹腺内プロラクチン受容体の発現解析 第 28 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム（富山）2003. 8 <b>蓮沼至</b>、松川浩、加藤節史、山本和俊、菊山 榮</p> <p>(7) ウシガエルプロラクチン受容体の cDNA クローニング 第 27 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム（岡山）2002.11 <b>蓮沼至</b>、山本和俊、菊山 榮</p> <p>(8) プロラクチンは中枢に作用してイモリ求愛行動を誘起する 第 27 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム（岡山）2002. 11 豊田ふみよ、山本和俊、<b>蓮沼至</b>、山下勝幸、菊山 榮</p> <p>(9) イモリプロラクチン mRNA 発現におよぼす温度の影響 日本動物学会第 71 回大会（東京）2000.9 <b>蓮沼至</b>、岩田武男、梅沢邦明、山本和俊、菊山 榮</p> <p>(1) Newt prolactin and its involvement in reproduction <i>Can. J. Physiol. Pharm.</i>(2000) 78, 984-993. Sakae Kikuyama, Takashi Yazawa, Shin-ichi Abe, Kazutoshi Yamamoto, Takeo Iwata, Kouichi Hoshi, <b>Itaru Hasunuma</b>, G. Mosconi, A.M. Polzonetti-Magni</p>

## 研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）